

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

AA

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/39	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/32964 (43) Date de publication internationale: 24 octobre 1996 (24.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00609 (22) Date de dépôt international: 22 avril 1996 (22.04.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/04739 20 avril 1995 (20.04.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES-SEPPIC [FR/FR]; 75, quai d'Orsay, F-75321 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): GANNE, Vincent [FR/FR]; 13 quater, avenue du Clos, F-94210 La Varenne-Saint-Hilaire (FR). (74) Mandataires: HUBERT, Philippe etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: THERAPEUTIC COMPOSITION COMPRISING AN ANTIGEN OR AN IN VIVO GENERATOR FOR GENERATING A COMPOUND COMPRISING AN AMINO ACID SEQUENCE		
(54) Titre: COMPOSITION THERAPEUTIQUE COMPRENANT UN ANTIGÈNE OU UN GÉNÉRATEUR IN VIVO D'UN COMPOSÉ COMPRENANT UNE SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns a therapeutic composition comprising (i) at least one antigen or at least one in vivo generator for generating a compound comprising an amino acid sequence, and (ii) at least one adjuvant, characterized in that the adjuvant comprises at least one pharmaceutically acceptable salt which is soluble in water, said salt comprising an organic anion and a metallic cation. The invention further concerns the use of a pharmaceutically acceptable soluble salt of this type for preparing a therapeutic composition.</p>		
(57) Abrégé		
<p>Une composition thérapeutique comprenant (i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés et (ii) au moins un adjuvant, caractérisée en ce que ledit adjuvant consiste en au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau, ledit sel étant constitué d'un anion organique et d'un cation métallique. L'utilisation d'un tel sel pharmaceutiquement acceptable et soluble pour la préparation d'une composition thérapeutique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Monolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Composition thérapeutique comprenant un antigène ou un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés.

La présente invention concerne une composition thérapeutique comprenant au moins un antigène, notamment un antigène d'origine virale, bactérienne ou parasitaire ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, et au moins un adjuvant. Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci concerne l'utilisation nouvelle d'un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau en tant qu'adjuvant.

L'utilisation d'adjuvants dans des compositions thérapeutiques du type vaccin est connue depuis longtemps. Ces adjuvants ont pour objet principal de permettre l'augmentation de la réponse immunitaire spécifique.

Ces adjuvants sont de nature diverse. Ils peuvent par exemple consister en des liposomes, des phases huileuses, par exemple du type adjuvants de Freund, généralement utilisées sous forme d'une émulsion avec une phase aqueuse, ou, de manière plus courante, en des sels minéraux insolubles dans l'eau. Ces sels minéraux peuvent consister par exemple en l'hydroxyde d'aluminium, le sulfate de zinc, l'hydroxyde de fer colloïdal, le phosphate de calcium ou le chlorure de calcium. L'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$) est l'adjuvant le plus couramment utilisé. Ces adjuvants sont décrits notamment dans l'article de Rajesh K. Gupta et al "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vaccine, vol. 11, Issue 3, 1993, pages 993-306.

Les adjuvants mentionnés ci-dessus présentent l'inconvénient d'une efficacité limitée. Par ailleurs, ils peuvent induire une certaine toxicité vis à vis des sujets traités. Plus particulièrement, lorsque ces compositions thérapeutiques sont injectées, on observe la formation de lésions et d'autres réactions locales telles que des granulomes au niveau du point d'injection. Ces inconvénients sont moins fortement marqués lorsque l'adjuvant est l'hydroxyde d'aluminium. C'est pourquoi ce dernier composé est l'un des adjuvants les plus couramment utilisés. Cependant, depuis peu, tous les composés à base d'aluminium et par conséquent l'hydroxyde d'aluminium sont suspectés d'être un facteur favorisant l'apparition de certaines maladies, telles des dysfonctionnements rénaux ou la maladie d'Alzheimer. En outre, il est connu que l'hydroxyde d'aluminium n'induit efficacement qu'une immunité humorale, et non une immunité cellulaire.

Un premier objet de l'invention consiste en des compositions thérapeutiques comprenant un adjuvant permettant une augmentation de la réponse immune au moins égale à celle conférée par l'hydroxyde d'aluminium, sans engendrer de lésions ou de réactions locales du type granulomes et qui ne soit pas susceptible de favoriser l'apparition de maladies chez le sujet traité.

Dans le cadre de la présente invention, la réponse immune dont l'augmentation est favorisée par l'adjuvant est une réponse spécifique qui s'exerce vis-à-vis de la substance immunisante.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition thérapeutique comprenant un adjuvant induisant efficacement aussi bien une immunité cellulaire qu'une immunité humorale.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation de nouveaux adjuvants pour la préparation d'une composition thérapeutique.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne de nouvelles compositions adjuvantes utiles pour la préparation de compositions thérapeutiques.

La présente invention concerne ainsi une composition thérapeutique comprenant (i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés et (ii) au moins un adjuvant, caractérisée en ce que ledit adjuvant consiste en au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau, ledit sel étant constitué d'un anion organique et d'un cation métallique choisi dans le groupe constitué par le manganèse, le calcium et le zinc.

Le manganèse est un métal tout particulièrement préféré dans le cadre de la présente invention. Il a en effet été constaté que les sels pharmaceutiquement acceptables et solubles dans l'eau selon l'invention comprenant un cation Mn^{2+} permettaient l'induction d'une réponse immune particulièrement importante, tout en présentant une toxicité faible.

Un sel soluble dans l'eau, au sens de la présente invention, peut être tel que sa solubilité dans l'eau est supérieure ou égale à 10 g/l, de préférence comprise entre 10 et 2000 g/l.

L'anion organique constitutif dudit sel pharmaceutiquement acceptable est avantageusement un anion d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné, de préférence un groupe phosphorique $-PO_4 H_2$ ou un groupe carboxylique $-COOH$.

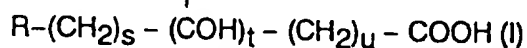
L'acide glycérophosphorique est un anion à groupe phosphorique préféré.

Les anions comprenant au moins un groupe carboxylique préférés sont dérivés de composés choisis parmi :

- 5 - les oses acides, de préférence les oses acides ayant de 5 à 7 atomes de carbone, plus préférentiellement ceux ayant 6 ou 7 atomes de carbone,
- les acides mono ou polycarboxyliques,
- les acides aminés.

10 Les acides mono ou polycarboxyliques préférés sont l'acide fumarique et les composés de formule (I) :

$$R'$$

$$|$$


15 où : R représente COOH, CH₃ CO, CH₃ ou CH₂OH,
 R' représente H ou COOH

et s, t et u, identiques ou différents sont compris entre 0 et 3.

Des composés de formule (I) préférés sont l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide malique, l'acide citrique ou l'acide pyruvique.

20 Au sens de la présente invention, un ose acide consiste en un ose comprenant au moins une fonction carboxylique, un ose étant un glucide constitué par les sucres réducteurs. Ces oses acides sont avantageusement des dérivés d'aldoses, obtenus par oxydation de la fonction alcool primaire ou de la fonction aldéhydrique en fonction carboxylique. De tels composés

25 peuvent tout particulièrement consister en l'acide gluconique, l'acide glucuronique, l'acide fructoheptonique, l'acide gluconoheptonique, l'acide glucoheptonique. Lorsque l'anion organique est dérivé d'un acide aminé, cet acide aminé peut être un acide α-aminé tel l'acide glutamique, la méthionine et, tout particulièrement, l'acide aspartique.

30 Un sel pharmaceutiquement acceptable, soluble dans l'eau selon l'invention peut comprendre un cation divalent tel que défini précédemment, associé à un anion organique ou à plusieurs anions organiques de nature différente. Ainsi, à titre d'exemple, un cation divalent tel le cation du calcium peut être associé à un anion dérivé de l'acide gluconoheptonique et un anion

35 dérivé de l'acide gluconique.

Un adjuvant soluble dans l'eau tout particulièrement préféré dans le cadre de la présente invention consiste en le gluconate de manganèse.

Une composition thérapeutique selon la présente invention peut comprendre entre 0,01 et 1000 mg/ml, de préférence entre 0,1 et 150 mg/ml
5 d'un adjuvant tel que défini ci-dessus.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être préparée par simple mélange d'une suspension aqueuse contenant l'antigène ou ledit générateur in vivo avec une solution aqueuse du sel défini ci-dessus.

La composition thérapeutique selon l'invention, outre l'adjuvant
10 consistant en un sel pharmaceutiquement acceptable soluble dans l'eau, tel que défini ci-dessus, peut également comprendre un adjuvant huileux. Dans un tel cas, la composition thérapeutique selon l'invention se présente avantageusement sous la forme d'une émulsion associant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile.

15 Cette émulsion peut être du type eau dans huile (E/H), ou, préférentiellement du type huile dans eau (H/E), eau dans huile dans eau (E/H/E) ou microémulsion. Une telle émulsion peut être préparée selon les méthodes classiques de préparation d'une émulsion, notamment selon les procédés décrits dans les demandes de brevets EP-A-489.181 et EP-A-
20 481.982. Ainsi, on peut émulsionner sous agitation l'huile constitutive de la phase huile avec la phase aqueuse constituée d'une solution ou d'une suspension aqueuse contenant l'antigène.

Une émulsion selon l'invention peut comporter, en poids, de 0,5 % à 99,5 % de phase huile pour 99,5 % à 0,5 % de phase aqueuse, de
25 préférence, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, plus préférentiellement, de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse. L'émulsion doit être stable de préférence pendant au moins 12 mois quand elle est stockée à 4°C.

L'adjuvant huileux peut être une huile minérale, une huile non
30 minérale ou un mélange d'une huile minérale et d'une huile non minérale. Lesdites huiles minérales peuvent être naturelles ou synthétiques. Lesdites huiles non minérales peuvent être d'origine végétale, animale ou synthétique. Avantageusement, les huiles non minérales sont métabolisables. Toutes ces huiles sont dépourvues d'effets toxiques à l'égard de l'organisme hôte chez
35 lequel la composition de l'invention est administrée. Elles sont de préférence

liquides à la température de stockage (environ +4°C) ou, au moins, permettent de donner des émulsions liquides à cette température. Une huile minérale avantageuse selon l'invention peut consister en une huile comprenant une chaîne carbonée linéaire ayant un nombre d'atomes de carbone de préférence supérieur à 16, et exempte de composés aromatiques. De telles huiles peuvent être par exemple celles commercialisées sous la désignation "MARCOL 52" (produit par Esso France) ou "DRAKEOL 6VR" (produite par Penreco USA).

A titre d'huiles non minérales synthétiques, on peut citer les polyisobutènes, les polyisoprènes, les esters d'alcools et d'acides gras, tels que, par exemple, l'oléate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, les mono, di ou triglycérides, les esters de propylène glycol, les glycérides partiels, tels les glycérides d'huile de maïs comme ceux commercialisés par la société SEPPIC sous la désignation LANOL TM, la maïsine ou l'oléate d'oléyle. Parmi les huiles végétales, on peut citer des huiles insaturées riches en acide oléique qui sont biodégradables, par exemple les huiles d'arachide, d'olive, de sésame, de soja ou de germes de blé.

Les huiles animales peuvent consister notamment en le squalène, le squalane ou l'huile de spermaceti.

Par ailleurs, la composition thérapeutique selon l'invention, quand elle se présente sous forme d'une émulsion telle que définie plus haut, peut également avantageusement comporter un ou plusieurs agents tensioactifs. Ce dernier présente un caractère lipophile ou hydrophile caractérisé par une valeur HLB (hydrophile-lipophile-balance) comprise entre 1 et 19.

Un tel tensioactif peut consister en :

* un alkylpolyglycoside ou un mélange d'alkylpolyglycosides de formule $Ra-(O)_n-Z$ où Ra représente un radical aliphatique saturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 4 à 24 atomes de carbone, de préférence de 8 à 22 atomes de carbone, Z est le reste d'un sucre, de préférence le glucose et n est compris entre 1 et 5, de préférence entre 1,1 et 2,

* les saponines,

* les lécithines,

* les alcanols polyoxyéthylés, tels ceux commercialisés sous la désignation BRIJ par la société ICI,

* les polymères comprenant des blocs polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes, tels ceux commercialisés sous la désignation PLURONICS par la société BASF.

5 Des tensioactifs particulièrement préférés sont les esters de polyéthylèneglycol, obtenus par condensation d'un acide gras, notamment un acide gras liquide à 20°C, avec un polyéthylèneglycol de poids moléculaire compris entre 80 et 2000 ; un tel tensioactif est commercialisé par la Société SEPPIC sous la marque SIMULSOL 2599.

10 Un autre agent tensioactif préféré dans le cadre de la présente invention consiste en un ester obtenu par condensation d'un acide gras, avantageusement un acide gras liquide à 20°C, avec un sucre, le sorbitol ou du glycérol. Ledit sucre peut consister en le glucose, le saccharose ou, de préférence, le mannitol. A titre d'ester de mannitol particulièrement préféré, on peut citer des oléates de mannitol obtenus par anhydrisation de la chaîne
15 carbonée polyhydroxylée du mannitol qui se cyclise en 1-4 ou en 2-6.

Des dérivés de ces esters de sucre de polyéthylèneglycole, de sorbitol ou de glycérol peuvent être également mis en oeuvre. Ces dérivés présentent une hydrophilie modifiée notamment par greffage de fonctions hydrophiles telles alcool, polyol, oxyde d'éthylène, oxyde de propylène, acide
20 carboxylique, amine, ou amide. De tels dérivés peuvent par exemple consister en les esters gras de sorbitanne polyoxyéthylés, tels les TWEEN (conf. l'International cosmetic Ingredient Dictionary, 5^{ème} éd., 1993).

Un autre type de tensioactif préféré consiste en les huiles végétales éthoxylés, telles que, par exemple, l'huile de ricin éthoxylée, cette huile étant hydrogénée
25 ou non.

Un agent tensioactif selon l'invention est de préférence pharmaceutiquement acceptable pour un usage en injectable ; il doit être notamment dépourvu de métaux lourds et présenter des indices d'acides ou de peroxydes très faibles. Il est également souhaitable qu'il satisfasse les
30 normes de tests d'innocuités tel que par exemple, ceux décrits par S.S. Berlin, Annales of Allergy, 1962, 20, 473 ou les tests de toxicité anormale décrits dans la pharmacopée européenne. Préférentiellement, l'agent tensioactif est associé à l'adjuvant huileux avant formation de l'émulsion.

La concentration en l'agent tensioactif dans la composition thérapeutique peut être comprise entre 0,01 et 500 mg/ml, de préférence entre 0,1 et 200 mg/ml.

- 5 Des huiles associées avec un agent tensioactif (ester de mannitol) convenant tout particulièrement dans le cadre de la présente invention sont celles commercialisées par la Société SEPPIC sous la marque "MONTANIDE". La nature de ces huiles, le type d'émulsion qu'elles permettent d'obtenir et les caractéristiques (viscosité et conductivité) de ces émulsions figurent dans le tableau 1 ci-après :

10

Tableau 1 :

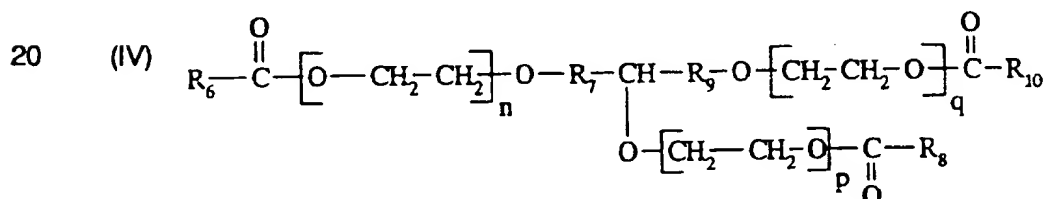
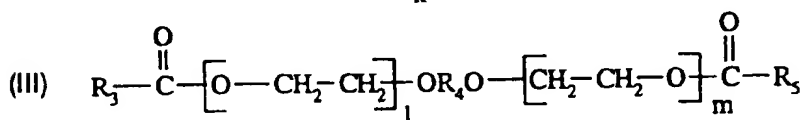
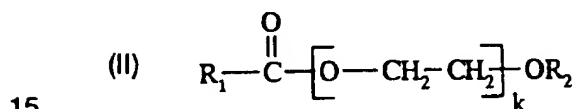
N°	Nom commercial	Huile/esters de mannitol	Type de l'émulsion	Phase aqueuse/émulsion (% en poids)	Viscosité (mPa.s)	Conductivité à 25°C ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)
1	MONTANIDE ISA 25	Minérale	H/E	75 %	20	5000
2	MONTANIDE ISA 25A	Minérale + avridine	H/E	75 %	20	5000
3	MONTANIDE ISA 28	Minérale + oléate d'éthyle	H/E	75 %	25	1000
4	MONTANIDE ISA 206	Minérale	E/H/E	50 %	50	1000
5	MONTANIDE ISA 50	Minérale	E/H	50 %	200	1
6	MONTANIDE ISA 708	Végétale	E/H	30 %	70	1

* Avridine = N,N-dioctadecyl-N', N'-bis-(2-hydroxyéthyl)-propanediamine.

- 15 L'adjuvant huileux peut encore consister en une huile auto-émulsionnable, c'est-à-dire une préparation huileuse capable de former une émulsion stable avec une phase aqueuse, pratiquement sans apport d'énergie, par exemple par dispersion dans la phase aqueuse par agitation mécanique

lente. A ce titre, on peut citer des huiles auto-émulsionnables telles que celles connues dans la pharmacopée européenne sous les désignations Labrafil et Simulsol. Ces huiles sont des glycérides polyglycosés.

Des huiles auto-émulsionnables préférées sont celles décrites dans la demande de brevet français N° 9500497 déposée le 18 Janvier 1995, au nom de la Demanderesse, intitulée "utilisation d'esters d'acides gras éthoxylés comme composants auto-émulsionnables notamment utiles pour la préparation de compositions phytosanitaires ou de médicaments à usage vétérinaire ou humain", dont référence est intégrée à la présente description. Ces huiles consistent en des esters d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles :

- R₁, R₃, R₅, R₆, R₈ et R₁₀ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

- R₂, R₄, R₇ et R₉ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k, l+m, n+p+q, étant un nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre environ 5 et environ 9.

R_1 est de préférence choisi parmi les restes des acides palmitique, stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique et linolénique et R_2 représente un radical méthyle et k est un nombre entier compris entre 1 et 5, de préférence égal à 2, et par ailleurs, les esters d'acides gras éthoxylés de formule III préférés sont ceux où :

5 (i) - R_6 , R_8 et R_{10} représentent des chaînes hydrocarbonées ayant de 16 à 22 atomes de carbone correspondant notamment aux chaînes grasses de l'huile de colza, de maïs, de soja, d'arachide et de noyaux d'abricots.

10 - R_7 et R_9 représentent un groupe méthylène CH_2 ;
- n , p , q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 3 et 30, et de préférence égale à 20 ; ou

(ii) - R_6 , R_8 et R_{10} représentent des chaînes hydrocarbonées correspondant aux chaînes grasses de l'huile de ricin ;

15 - R_7 et R_9 représentent un radical méthylène CH_2 ;
- n , p , q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 5 et 7.

20 La concentration en huile auto-émulsionnable dans la composition thérapeutique selon l'invention peut être comprise entre environ 5 et 700 g/l, de préférence entre environ 10 et 500 g/l.

Outre la phase huile et la phase aqueuse, la composition selon l'invention peut comporter un agent stimulant immunitaire conventionnel tel l'Avridine®, soit la N,N -dioctadecyl- N',N' - bis (2-hydroxyethyl) propanediamine, les dérivés du MDP (muramyl dipeptide) notamment le
25 threonyl-MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du Lipide A.

La composition thérapeutique selon l'invention peut comprendre encore un ou plusieurs agents tensioactifs, en l'absence de tout adjuvant huileux.

30 La composition thérapeutique se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. Celle-ci peut être préparée par simple mélange de l'agent tensioactif avec une dispersion dans l'eau de l'antigène ou du générateur d'antigène in vivo.

L'agent tensioactif peut être choisi parmi les agents tensioactifs décrits plus haut, en association avec un adjuvant huileux.

Ladite solution micellaire peut comporter de 0,5 à 500 mg/ml, de préférence de 1 à 250 mg/ml en agent tensioactif.

Une composition thérapeutique selon la présente invention peut comprendre un antigène tel qu'un virus, un micro-organisme, plus particulièrement une bactérie ou un parasite, ou un composé comprenant une chaîne peptidique. Un tel composé peut consister en une protéine ou une glycoprotéine, notamment une protéine ou une glycoprotéine issues d'un micro-organisme, un peptide synthétique ou une protéine ou un peptide issu du génie génétique. Lesdits virus et micro-organisme peuvent être totalement inactivés ou vivants atténués. A titre de virus pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer le virus de la rage, les virus Aujeszky, Influenzae, le virus de la fièvre aphteuse ou les VIH. A titre de micro-organisme du type bactérien pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer E. coli et ceux des genres Pasteurella, Furonculosis, Vibriosis, Staphylococcus et Streptococcus. A titre de parasite, on peut citer ceux des genres Trypanosoma, Plasmodium et Leishmania.

Une composition thérapeutique selon l'invention comprend une concentration en antigène qui dépend de la nature de cet antigène et de la nature du sujet traité. Il est toutefois particulièrement remarquable qu'un adjuvant selon l'invention, associé ou non à un adjuvant huileux et/ou un agent tensioactif tels que définis plus haut, permet de diminuer d'une façon notable la dose habituelle d'antigène requise. La concentration adéquate d'antigène peut être déterminée de manière classique par l'homme du métier. Généralement, cette dose est de l'ordre de 0,1 µg/ml à 1g/ml plus généralement comprise entre 1 à µg/ml et 100mg/ml.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi comprendre un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, c'est-à-dire un composé biologique capable d'exprimer un tel composé dans l'organisme hôte dans lequel on a introduit ledit générateur in vivo. Le composé comprenant la séquence d'acides aminés, peut être une protéine, un peptide ou une glycoprotéine.

Ces générateurs in vivo sont généralement obtenus par des procédés issus du génie génétique.

Plus particulièrement, ils peuvent consister en des micro-organismes vivants, généralement un virus, jouant le rôle de vecteur

recombinant, dans lequel est inséré une séquence nucléotidique, notamment un gène exogène. Ces composés sont connus en tant que tels et utilisés notamment comme vaccin sous unitaire recombinant.

5 A cet égard, on peut se référer à l'Article de M. ELOIT et al., Journal of virology (1990) 71, 2925-2431, à la demande internationale WO-A-91.00107 ou à la demande internationale WO-A-94/16681.

Avantageusement, le micro-organisme constitutif d'un vaccin sous-unitaire recombinant est un virus recombinant non enveloppé, par exemple choisi parmi les adénovirus, le virus de la vaccine, le canarypox virus, les herpès virus ou les baculovirus. Le gène exogène inséré dans le
10 micro-organisme peut être, par exemple, issu d'un virus Aujeszky ou HIV.

Les générateurs in vivo selon l'invention peuvent aussi consister en un plasmide recombinant comprenant une séquence nucléotidique exogène, capable d'exprimer dans un organisme hôte un composé comprenant une
15 séquence d'acides aminés. De tels plasmides recombinants et leur mode d'administration dans un organisme hôte ont été décrits en 1990, par Lin et al., circulation 82:2217,2221 ; COX et al., J. of Virol, Sept. 1993, 67, 9, 5664-5667 et dans la demande internationale WO/FR 95/00345 du 21 Mars 1995, au nom de la demanderesse, intitulée "Une composition comprenant un plasmide
20 recombinant et ses utilisations comme vaccin et médicament".

Selon la nature de la séquence nucléotidique comprise dans le générateur in vivo, le composé comprenant la séquence d'acides aminés qui est exprimé au sein de l'organisme hôte, peut :

(i) être un antigène, et permettre le déclenchement d'une réaction
25 immune,

(ii) avoir une action curative vis-à-vis d'une maladie, essentiellement une maladie d'ordre fonctionnel, qui s'est déclenchée chez l'organisme hôte. Dans ce cas, le générateur in vivo permet un traitement thérapeutique de l'hôte, du type thérapie génique.

30 A titre d'exemple, une telle action curative peut consister en une synthèse par le générateur in vivo de cytokine, comme les interleukines, notamment l'interleukine 2. Celles-ci permettent le déclenchement ou le renforcement d'une réaction immune visant à l'élimination sélective des cellules cancéreuses.

La concentration en ledit générateur in vivo dans la composition thérapeutique selon l'invention dépend, là encore, notamment de la nature dudit générateur et de l'hôte dans lequel il est administré. Cette concentration peut être aisément déterminée par l'homme du métier, sur la base d'expériences de routine.

A titre indicatif, on peut toutefois préciser que lorsque le générateur in vivo est un microorganisme recombinant, sa concentration dans la composition thérapeutique selon l'invention peut être comprise entre 10^2 et 10^{15} microorganismes/ml, de préférence entre 10^5 et 10^{12} microorganismes/ml.

Lorsque le générateur in vivo est un plasmide recombinant, sa concentration dans la composition thérapeutique selon l'invention peut être comprise entre 0,01 et 100 g/l.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être utilisée comme médicament préventif ou curatif. Selon la nature de l'antigène ou du générateur in vivo, une composition thérapeutique selon l'invention peut être administrée à des poissons, des crustacés tels les crevettes, des volailles notamment, des oies, des dindes, des pigeons et des poulets, aux canidés tels le chien, aux félidés tels le chat, aux porcs, aux primates, aux bovidés, aux ovidés et aux chevaux. La composition thérapeutique selon l'invention comprenant un sel pharmaceutiquement acceptable soluble dans l'eau tel que défini ci-dessus, peut être également administrée à l'homme. L'administration de la composition thérapeutique peut se faire de manière classique, notamment par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale par voie orale ou par voie mucoale.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation d'un adjuvant consistant en un sel pharmaceutiquement acceptable soluble dans l'eau tel que défini ci-dessus pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie infectieuse, notamment une maladie infectieuse engendrée par un virus ou un micro-organisme tels ceux mentionnés plus haut.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation d'un sel pharmaceutiquement acceptable soluble dans l'eau pour la préparation d'une composition thérapeutique destiné à soigner une maladie d'ordre fonctionnelle, telle le cancer ou la mucoviscidose.

Dans l'une ou l'autre de ces utilisations, ledit sel pharmaceutiquement acceptable peut être associé à l'un au moins d'un adjuvant huileux, d'un agent tensioactif ou d'un adjuvant huileux lui-même associé à un agent tensioactif ; ces adjuvants huileux et tensioactifs étant tels que définis plus haut.

Des compositions adjuvantes comprenant ledit sel pharmaceutiquement acceptable et l'adjuvant huileux et/ou les tensioactifs précités constituent encore un autre aspect de l'invention. Le cas échéant, ces compositions adjuvantes comprennent au moins une phase aqueuse.

Dans ce dernier cas, les compositions adjuvantes selon l'invention, comprenant au moins un adjuvant huileux, et, le cas échéant, un tensioactif, peuvent se présenter sous la forme d'une émulsion. Cette dernière peut être du type E/H, H/E, E/H/E ou microémulsion.

Ces émulsions peuvent comprendre en poids, de 0,5 % à 99,5 % de phase huile pour 99,5 % à 0,5 % de phase aqueuse, de préférence, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, plus préférentiellement, de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse.

Le cas échéant, elles peuvent comprendre de 0,01 à 500 mg/ml, de préférence de 0,1 à 200 mg/ml d'au moins un tensioactif.

Lorsque la composition adjuvante selon l'invention ne comprend, outre le sel pharmaceutiquement acceptable et une phase aqueuse, qu'un ou plusieurs tensioactifs, elle se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. La teneur en tensioactif de cette solution micellaire peut être comprise entre 0,01 et 900 mg/ml, de préférence entre 1 et 250 mg/ml.

Une composition adjuvante selon l'invention comprend habituellement de 0,02 à 3000 mg/ml, de préférence 0,1 à 1000 mg/ml, plus préférentiellement de 0,1 à 150 mg/ml d'un sel pharmaceutiquement acceptable selon l'invention.

Ces compositions adjuvantes sont utiles pour préparer les compositions thérapeutiques selon l'invention.

Ces dernières peuvent alors être préparées par simple mélange de la composition adjuvante avec une composition comprenant un antigène ou un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés.

L'invention sera mieux comprise au regard des exemples et des figures ci-après.

Les exemples ont été réalisés sur des souris OF1 dont le poids moyen était compris entre 18 et 20 g.

5 Les résultats exprimés sont une moyenne des résultats obtenus sur 10 souris.

Les compositions thérapeutiques comprenaient, à titre d'antigène, de la sérum albumine bovine (BSA), Grade V, Sigma.

10 Les compositions thérapeutiques ont été injectées par voie sous-cutanée.

La réponse immunitaire humorale a été déterminée par dosage des IgG totales et des IgG₁, selon la méthode ELISA.

La réponse immunitaire cellulaire a été déterminée par dosage des IgG_{2a}, selon la méthode ELISA.

15 Les titres anticorps exprimés dans les exemples, correspondent à la dernière dilution au-dessus du bruit de fond.

Les abréviations suivantes sont utilisées dans les exemples :

- Glu = gluconate
- Fruhp = fructoheptonate
- 20 - Gly = glycérophosphate
- Gluhp = glucoheptonate
- Al(OH)₃ = hydroxyde d'aluminium
- Asp = acide aspartique

Ainsi, à titre d'exemple, GluMn est le gluconate de manganèse.

25 **Exemple 1**

On prépare des compositions thérapeutiques (ou doses) de 100 µl chacune, comprenant 50 µg de BSA.

Ces compositions thérapeutiques ont été injectées chez les souris à J0 (soit le jour de l'injection).

30 On a déterminé le taux d'anticorps anti-BSA à 14 et 28 jours après l'injection (réponse primaire).

A J28, on a injecté une même composition thérapeutique aux mêmes souris.

On a déterminé le taux d'anticorps anti-BSA à J42 et J56.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau II ci-dessous. Tableau II :

Composi- tions vac- ci- nales	Adjuvant	Doses d'adjuvant (en mg/dose)	Anticorps anti-BSA / réponse primaire (J14)	Anticorps anti-BSA / réponse primaire (J28)	Anticorps anti-BSA / réponse primaire (J42)	Anticorps anti-BSA / réponse secondaire (J56)
1	-	-	< 500	< 500	< 500	< 500
2	GluMn	1	64000	32000	256000	256000
3	GluCa	3	16000	8000	128000	96000
4	FruhpcCa	1	4000	2000	64000	48000
5	GlyCa	2	4000	2000	64000	64000
6	GluZn	0,5	16000	6000	96000	96000
7	GluhpZn	1	8000	6000	64000	64000
8	AspMg	1	< 500	< 500	< 500	< 500
9	Asp Mg/K	1	< 500	< 500	< 500	< 500
10	Asp Ca	1	4000	4000	48000	48000
11	Asp Mn	1	32000	32000	128000	128000
	Témoin	-	< 500	< 500	< 500	< 500

5 La composition témoin correspond aux souris qui n'ont pas été vaccinées.

10 Les résultats obtenus montrent que l'addition des adjuvants selon l'invention dans une composition thérapeutique induit une activité immuno-stimulante significative par rapport au témoin non vacciné et aux compositions thérapeutiques ne comprenant pas d'adjuvant.

15 Ces résultats montrent également la nette supériorité des sels divalents du zinc, du manganèse et du calcium vis-à-vis de l'aspartate de magnésium qui n'induit pas une activité immuno-stimulante significative par rapport au témoin non vacciné ou aux compositions ne comprenant pas d'adjuvant.

On peut aussi noter que le GluMn, bien qu'utilisé à une concentration faible, permet l'obtention d'un taux d'anticorps particulièrement élevé.

Exemple 2

5 On a comparé l'effet immunostimulant d'un sel soluble dans l'eau selon l'invention, GluMn, avec celui d'un sel insoluble, $Al(OH)_3$.

Les compositions thérapeutiques (dose/souris) d'un volume de 100 μl mises en oeuvre comprenaient 50 μg d'antigène et 1 mg d' $Al(OH)_3$.

On a également injecté des doses ne comprenant pas d'adjuvant.

10 Un lot de souris n'a pas été vacciné (témoin).

Les résultats obtenus figurent dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III :

Adjuvant	IgG1 réponse primaire J14	IgG1 réponse primaire J28	IgG1 réponse secon- daire J42	IgG1 réponse secon- daire J56	IgG2a réponse primaire J14	IgG2a réponse primaire J28	IgG2a réponse secon- daire J42	IgG2a réponse secon- daire J56
-	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500
GluMn	32000	64000	256000	256000	4000	8000	24000	64000
$Al(OH)_3$	16000	64000	128000	256000	1000	6000	8000	32000
Témoin	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500

Les IgG1 sont représentatifs de la réponse humorale.

Les IgG2 sont représentatifs de la réponse cellulaire.

15 Les réponses humorales et cellulaires obtenues avec un adjuvant selon l'invention sont supérieures à celles obtenues avec un adjuvant conventionnel tel $Al(OH)_3$.

Exemple 3

20 Afin de mettre en évidence l'effet de synergie entre un adjuvant du type sel soluble dans l'eau avec un adjuvant huileux (le Montanide ISA 25 défini dans le tableau I), on a comparé l'effet de diverses compositions thérapeutiques. Chacune d'elles comprenait 50 μg d'antigène et avait un volume de 100 μl (dose/souris).

Les résultats obtenus figurent dans le tableau IV ci-dessous :

Tableau IV :

Sel soluble dans l'eau	Quantité de sel (mg/dose)	Montanide ISA25 (en mg/dose)	Immunité humorale (J14)	Immunité cellulaire (J14)
-	-	25	24000	3000
GluMn	1	-	64000	4000
GluMn	1	25	96000	8000
GluMn	0,5	-	16000	< 2000
GluMn	0,5	25	96000	6000

5 L'association d'un adjuvant huileux à un sel soluble selon l'invention permet l'obtention d'un titre anticorps supérieur à celui obtenu par la simple addition des titres anticorps obtenu avec chacun de ces adjuvants mis en oeuvre individuellement. Une synergie est bien démontrée. Cette synergie est encore plus fortement marquée pour une quantité faible (0,5 mg/dose) de GluMn.

Exemple 4

10 Pour démontrer l'importance du caractère organique de l'anion, on a comparé l'effet immunostimulant de différents sels de calcium.

Chaque composition thérapeutique, d'un volume de 100 μ l contenait 50 μ g d'antigène et, à l'exception du témoin, 0,5 mg d'un sel de calcium, de sorte que la concentration en calcium de chaque composition soit de 2,7 mg.

15 Le dosage des anticorps a été effectué 42 jours après la vaccination.

L'injection de la composition thérapeutique a été répétée à J28. Le dosage des anticorps a été effectué à J42.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau V :

Tableau V :

Sels	Réponse humorale	Réponse cellulaire
CaCO ₃	32000	4000
CaCl ₂	64000	24000
CaHPO ₄	64000	10000
GluCa	128000	32000
-	3000	< 2000

Il a été constaté au cours de ces tests que le CaCl_2 induit des lésions très importantes.

5 **Exemple 5**

On a injecté à différents lots comprenant chacun 5 souris, une composition thérapeutique d'un volume de 100 μl , comprenant 50 μg d'antigène. On a évalué les réactions locales (lésions et granulomes) à J8 et J35.

10 Les résultats obtenus figurent dans les tableaux VI et VII, respectivement.

Tableau VI (J8) :

	Souris N°	1	2	3	4	5
	----- Concentration en sel (mg/dose)					
GluMn	1	+	+	-	-	+
GlyMn	1	L	+	++	+	-
GluMn(*)	1	++	+++	+	-	+
GluCa	1	-	-	-	-	-
MnCl2+	1	+++	L	L	L	L
Al(OH)3	1	+++	+++	++	+++	++++

Tableau VII (J35) :

	Souris N°	1	2	3	4	5
	----- Concentration en sel (mg/dose					
GluMn	1	-	+	+	+	-
GlyMn	1	-	+	+	+	+
GluMn(*)	1	++	++	++	+++	+
GluCa	1	-	-	-	-	-
MnCl ₂ +	1	+++	LL	LL	L	L
Al(OH) ₃	1	++++	+++	++	+++	++++

(*) : GluMn associé à 25 mg de MONTANIDE ISA 25

- 5 - = pas de granulome
 + = petit granulome
 ++ = granulome moyen
 +++ = granulome important
 ++++ = granulome très important
- 10 - = pas de lésions
 L = petite lésion
 LL = lésion moyenne
 LLL = lésion importante
 LLLL = lésion très importante
- 15 DCD = souris mortes pendant l'expérience.

La concentration en Al(OH)₃ choisie correspond à la concentration à laquelle ce sel a permis l'obtention d'une réponse immunitaire la plus importante. Cette concentration en Al(OH)₃ est celle mise en oeuvre dans les exemples ci-dessus.

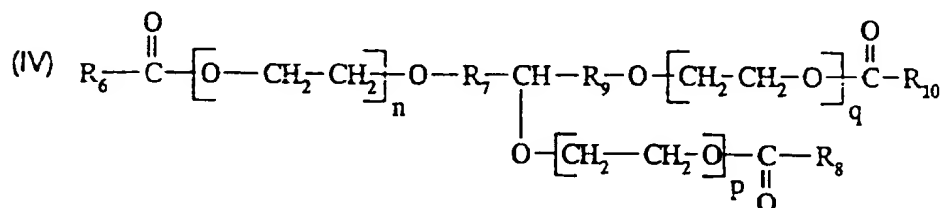
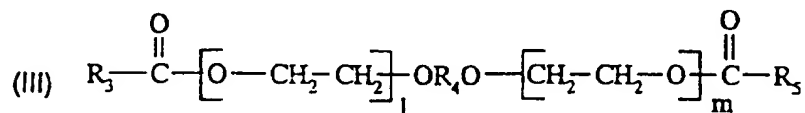
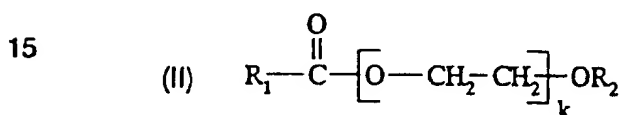
REVENDICATIONS

1. Composition thérapeutique comprenant (i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés et (ii) au moins un adjuvant, caractérisée en ce que ledit
5 adjuvant consiste en au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau, ledit sel étant constitué d'un anion organique et d'un cation métallique divalent choisi dans le groupe constitué par le manganèse, le calcium et le zinc.
2. Composition thérapeutique selon la revendication 1, caractérisée
10 en ce que le cation métallique divalent est le manganèse .
3. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné
4. Composition thérapeutique selon la revendication 3, caractérisée
15 en ce que le groupe fonctionnel est un groupe carboxylique ou un groupe phosphorique.
5. Composition thérapeutique selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé choisi dans le groupe constitué par les acides aminés, les oses acides comprenant de 5 à 7 atomes
20 de carbone, et l'acide glycérophosphorique.
6. Composition thérapeutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'acide aminé est l'acide aspartique.
7. Composition thérapeutique selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'ose acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide
25 gluconique, l'acide fructoheptonique et l'acide glucoheptonique.
8. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le sel pharmaceutiquement acceptable est le gluconate de manganèse.
9. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 1 à 8,
30 caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une émulsion comprenant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile, la phase huile étant constituée par un adjuvant.
10. Composition thérapeutique selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'émulsion est du type E/H/E, H/E ou microémulsion.

11. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est associé à un agent tensioactif, de préférence un agent tensioactif consistant en (i) un ester obtenu par condensation d'un acide gras avec un sucre, un polyéthylèneglycol, le sorbitol du glycérol, ou un dérivé d'un tel ester dont l'hydrophilie a été modifiée et (ii) une huile végétale éthoxylée.

12. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est une huile auto-émulsionnable.

13. Composition thérapeutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est un ester d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles :

- R₁, R₃, R₅, R₆, R₈ et R₁₀ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

- R₂, R₄, R₇ et R₉ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k, l+m, n+p+q, étant un nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits

composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre environ 5 et environ 9.

5 14. Composition thérapeutique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un agent tensioactif, ladite composition se présentant sous la forme d'une solution micellaire.

15 15. Composition thérapeutique selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'agent tensioactif est (i) un ester obtenu par condensation d'un acide gras avec un sucre ou du glycérol, ou un dérivé d'un tel ester dont l'hydrophilie a été modifiée ou (ii) une huile végétale éthoxylée

10 16. Utilisation d'un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies infectieuses.

15 17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que le sel est associé à un composé choisi dans le groupe constitué par un adjuvant huileux, un tensioactif et un adjuvant huileux associé à un agent tensio-actif.

20 18. Utilisation d'un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à soigner une maladie fonctionnelle.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que ledit sel est associé à un composé choisi dans le groupe constitué par un adjuvant huileux, un agent tensioactif et un adjuvant huileux associé à un agent tensioactif.

25 20. Composition adjuvante comprenant un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, et au moins un composé choisi dans le groupe constitué par, un adjuvant huileux, un tensioactif et un adjuvant huileux associé à un tensioactif.

30 21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une phase aqueuse.

22. Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une émulsion.

23. Composition selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une solution micellaire.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/00609

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 674 755 (THOREL J.) 9 October 1992 see the whole document	1
A	FR,A,2 672 495 (VACSYN FRANCE) 14 August 1992 see the whole document	1-23
A	EP,A,0 224 260 (TOHO YAKKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 3 June 1987 see the whole document	1-23
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 August 1996

Date of mailing of the international search report

14.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00609

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 23, 8 December 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 202906, BELOKRYLOV, G. A.: "The immunostimulating property of aspartic acid" XP002010599 see abstract & BYULL. EKSP. BIOL. MED. (1986), 102(8), 213-15,</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PLT/FR 96/00609

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2674755	09-10-92	NONE	
FR-A-2672495	14-08-92	NONE	
EP-A-224260	03-06-87	JP-A- 63030495	09-02-88
		JP-A- 63044588	25-02-88
		JP-A- 62129292	11-06-87
		US-A- 4746742	24-05-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No
PCT/FR 96/00609

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/39

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR,A,2 674 755 (THOREL J.) 9 Octobre 1992 voir le document en entier ---	1
A	FR,A,2 672 495 (VACSYN FRANCE) 14 Août 1992 voir le document en entier ---	1-23
A	EP,A,0 224 260 (TOHO YAKKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 3 Juin 1987 voir le document en entier ---	1-23
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (celle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14.08.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PLI/FR 96/00609

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 23, 8 Décembre 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 202906, BELOKRYLOV, G. A.: "The immunostimulating property of aspartic acid" XP002010599 voir abrégé & BYULL. EKSP. BIOL. MED. (1986), 102(8), 213-15,</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,4-6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : Membres de familles de brevets

Der le Internationale No

PCI/FR 96/00609

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2674755	09-10-92	AUCUN	
FR-A-2672495	14-08-92	AUCUN	
EP-A-224260	03-06-87	JP-A- 63030495	09-02-88
		JP-A- 63044588	25-02-88
		JP-A- 62129292	11-06-87
		US-A- 4746742	24-05-88